



1652

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
ZOCHER et al.

Serial No. 10/031,702

Filed: January 23, 2002

For: EPOXIDE HYDROLASE FROM STREPTOMYCES

Art Unit: 1652

Examiner: Patterson

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231, on:

3/2/04

Date of Deposit

Herbert B. Keil

Person Making Deposit

Signature

CLAIM TO PRIORITY

Hon. Commissioner of Patents
and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in Germany under the International (Paris) Convention for the Protection of Industrial Property (Stockholm Act July 14, 1967) is hereby requested and the right of priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed.

Germany: 199 35 113.9

Filed : July 27, 1999

A certified copy of the priority document is attached. Also attached is the English language translation.

Respectfully submitted,

KEIL & WEINKAUF

H.B. Keil
Herbert B. Keil
Reg. No. 18,967

1350 Connecticut Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20036
(202) 659-0100



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

I, Susan ANTHONY BA, ACIS,

Director of RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare;

1. That I am a citizen of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland.
2. That the translator responsible for the attached translation is well acquainted with the German and English languages.
3. That the attached is, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, a true translation into the English language of the accompanying copy of the specification filed with the application for a patent in Germany on 27 July 1999 under the number 199 35 113.9 and the official certificate attached hereto.
4. That I believe that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application in the United States of America or any patent issuing thereon.

For and on behalf of RWS Group plc

The 17th day of February 2004



FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

[Eagle crest]

**Priority Certificate
for the filing of a Patent Application**

File Reference: 199 35 113.9

Filing date: 27 July 1999

Applicant/Proprietor: BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen/DE

Title: Epoxide hydrolases from Streptomyces

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 12 P

The attached documents are a correct and accurate reproduction of the original submission for this Application.

Munich, 5 February 2004

German Patent and Trademark Office

The President

[Seal of the German Patent
and Trademark Office]

pp

[signature]

Dzierzon



Epoxide hydrolases from Streptomyces

The invention relates to improved epoxide hydrolases which can be isolated from bacteria of the genus Streptomyces, a novel process for the enzymatic separation of epoxide enantiomer mixtures, a novel detection method for epoxide hydrolase activity, a screening method for detecting epoxide hydrolase activity and the use of bacteria of the genus Streptomyces and the resultant epoxide hydrolases for enantioselective epoxide hydrolysis.

The increasing importance of enantiomerically pure compounds, especially in the pharmaceutical and agrochemical industries, requires reliable and economic access to optically active substances. To prepare enantiomerically pure diols and epoxides, a number of methods are available.

In asymmetric chemical synthesis of epoxides, synthesis starts from a prochiral compound. By using a chiral reagent, for example a chiral peracid, a chiral dioxirane or oxaziridine or a chiral borate, a chiral auxiliary or a chiral, metallic or nonmetallic catalyst, a chiral epoxide is formed. The best known pathway for synthesizing chiral epoxides is the Sharpless epoxidation of alkenols, for example allyl alcohols, with hydroperoxides in the presence of transition metal catalysts.

Preparation of enantiomerically pure diols by a biochemical pathway is also known. Microorganisms having epoxide hydrolase activity catalyze the regiospecific and enantiospecific hydrolysis of epoxides. They cleave the ether bond in epoxides, forming diols. Some bacterial strains have already been described which enable a broad selection of racemic epoxides to be hydrolyzed enantioselectively. However, the number of known epoxide hydrolases and their

application to organic synthesis has been restricted to date. Known strains having epoxide hydrolase activity are, for example, *Aspergillus niger* LCP521, *Bacillus sulfurescent* ATCC 7159, *Rhodococcus* species NCIMB 11216 and others.

However, the known strains having epoxide hydrolase activity often have a restricted substrate spectrum and low reaction rates. Also, the enantioselectivities which can be achieved using these strains are frequently too low [Grogan, G., et al., *FEMS Microbiology Lett.* 141 (1996), 239 - 243; Kroutil, W., et al., *Tetrahedron Lett.* (1996), 8379 - 8382]. The known strains are difficult to manipulate genetically and some are difficult to culture. Therefore, to date, only two epoxide hydrolases are available in recombinant form in *E.coli* [*Corynebacterium* sp. C12, (Misawa, E., et al., *Eur. J. Biochem.* 253 (1998), 173 - 183) and *Agrobacterium radiobacter* AD1 (Rink, R., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 14650 - 14657)]. Even purification of the epoxide hydrolases obtained from the microorganisms has to date only been described for *Rhodococcus* species NCIMB 11216 [Faber, K., et al., *Biotechnology Lett.* 17 (1995), 893 - 898] and *Norcardia* EH 1 [Kroutil, W., et al. *J. Biotechnol.* 61 (1998), 143 - 150]. This was highly complex in both cases. The enrichment of epoxide hydrolases from *Corynebacterium* sp. C12 is described by Misawa, E., et al., *Eur. J. Biochem.* 253, (1998) 173-183.

In addition, the search for novel epoxide hydrolase-containing microorganisms is made difficult owing to the fact that screening for novel epoxide-hydrolase-producing microorganisms, for example in collections of microbiological strains, has hitherto been highly time-consuming. This is due to the fact that, for screening, usually methods are used in which the individual batches must be worked up and analyzed individually by gas chromatography or liquid chromatography.

It is a first object of the invention, therefore, to provide novel epoxide hydrolases having an expanded substrate spectrum and/or improved reactivity and/or improved enantioselectivity. In addition, the novel
5 epoxide hydrolases should be more readily accessible, in particular, because they can be isolated from nonpathogenic organisms which can be readily cultured, and, in addition, if appropriate are readily accessible to methods of molecular biology.

10 It is a second object of the invention to provide a method for the more rapid and simpler detection of epoxide hydrolase, which should also allow improved screening for epoxide-hydrolase-producing micro-
15 organisms.

It is a third object of the invention to provide an improved biochemical process for separating epoxide enantiomer mixtures and thus an improved process for
20 the enantioselective reaction of epoxides which permits a simpler route to the enantiomerically pure diols and/or epoxides.

It is a fourth object of the invention to provide novel
25 epoxide-hydrolase-producing microorganisms.

We have found that the above first object is achieved, surprisingly, by providing epoxide hydrolases (E.C. 3.3.2.3) from microorganisms of the genus *Streptomyces*.
30 Epoxide hydrolase activity has not previously been described in microorganisms of this genus.

The inventive epoxide hydrolases have at least one of the following advantageous properties, compared with
35 previously known epoxide hydrolases:

- improved enantioselectivity in the resolution of enantiomeric epoxides;
- improved (expanded) substrate spectrum;

- improved reactivity;
 - enhanced accessibility to methods of molecular biology;
 - improved biochemical accessibility because the
- 5 microorganisms are easier to culture.

For the purposes of the invention, "improved enantio-selectivity" is when, for substantially the same conversion rate, a higher enantiomeric excess is

10 achievable.

For the purposes of the invention, an "expanded substrate spectrum" is that racemic mixtures of a plurality of epoxides are converted.

15

For the purposes of the invention, an "improved reactivity" is that the reaction takes place with a higher space-time yield.

20 The invention relates in particular to those epoxide hydrolases from Streptomyces that have at least one of the following properties:

a) hydrolytic epoxide cleavage of a styrene oxide, for example styrene oxide or a derivative thereof which is monosubstituted or polysubstituted on the phenyl ring or epoxide ring, such as in particular a styrene oxide which is monosubstituted in the meta or para position by nitro or halogen, in particular chlorine or bromine, and at least one

25 further compound selected from the group consisting of ethyl 3-phenylglycidate, n-hexane-1,2-oxide, n-decane-1,2-oxide and indene oxide, which can be unsubstituted or monosubstituted or

30 polysubstituted by substituents preferably in accordance with the above definition;

35

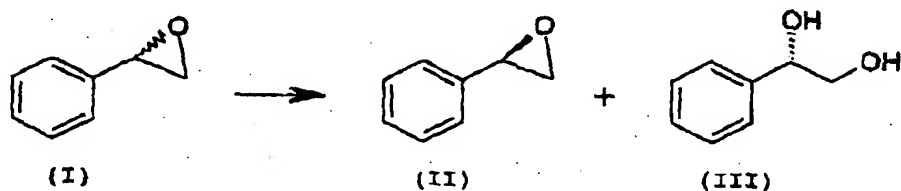
b) conversion of a racemate of styrene oxide with an enantioselectivity $E \geq 2$, for example ≥ 10 , for

instance from 10 to 100, to give (S)-phenyl-1,2-ethanol according to the reaction equation (A) given below, this conversion being able to be carried out using whole cells or a cell homogenate or an enriched or purified enzyme preparation, and preferably taking place in the presence of a cosolvent, for example from 5 to 10% (v/v) DMSO.

According to a preferred embodiment, the epoxide hydrolases provided are those which can be isolated from bacteria of the genus *Streptomyces*, in particular from the species *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* and *S. fradiae*, preferably from the strains *Streptomyces griseus* (DSM 40236 and DSM 13447), *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 4044 and DSM 13448), *Streptomyces arenae* Tü (DSM 40737 and DSM 12134) *Streptomyces antibioticus* Tü4 (DSM 12925) or *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131).

Particular preference is given to the epoxide hydrolase which can be isolated from *Streptomyces antibioticus* Tü4 (DSM 12925). This enzyme is characterized by its pronounced enantioselectivity and the conversion of (R/S)-styrene oxide (I) according to the following reaction equation (A)

Reaction equation (A):



to (S)-phenyl-1,2-ethanediol (III), with the non-hydrolysis of (R)-styrene oxide (II). Thus this enzyme in a reaction medium containing 10% (v/v) DMSO as solubilizer, catalyzes the above conversion at an enantioselectivity of $E = 13$ and an enantiomeric excess

ee[%] = 99 for (II) and ee[%] = 14 for (III).

Isolation of the enzyme is described in more detail in the examples. Unless stated otherwise, the enzyme is
5 enriched using standard biochemical methods, for example as described by T.G. Cooper in Biochemische Arbeitsmethoden [Biochemical methods], Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, (1981). Suitable methods, for example, are purification methods such as
10 precipitation, for example using ammonium sulfate, ion-exchange chromatography, gel chromatography, affinity chromatography, for example immunoaffinity chromatography, and isoelectric focusing, and combinations of these methods.

15 The invention also relates to a novel Streptomyces strain having the designation Streptomyces antibioticus Tü4, deposited at the DSMZ under the Deposit Number DSM 12925 and variants and mutants of this strain.

20 The invention also relates to functional analogs of the inventively prepared enzymes, such as variants, alleles and mutants, that have epoxide hydrolase activity and, preferably, have at least one of the abovementioned
25 advantageous properties.

We have found that the above second object was achieved, surprisingly, by providing an optical method of detection for epoxide hydrolase, which comprises
30

a) incubating an analyte, for example a microorganism culture, in which epoxide hydrolase activity is suspected with an epoxide-containing substrate for the epoxide hydrolase under reaction conditions;

35 b) chemically reacting unreacted epoxide with 4-nitrobenzylpyridine (NBP), forming a pigment absorbing at 560 nm; and

c) analyzing the solution from step b) for decrease in pigment concentration, relative to an epoxide-hydrolase-free control solution.

5 The inventive detection method can be carried out qualitatively, for example as a spot test, or quantitatively. In the quantitative method, the relative decrease in pigment concentration is first determined quantitatively, for example photometrically by determining absorption at 560 nm, and the epoxide hydrolase activity in the analyte is determined therefrom.

Suitable analytes are in principle microorganisms per se, for example samples from a freshly taken culture of a bacterium, cell homogenates thereof or fractions of these cell homogenates after purification. Preferably, the test is carried out using whole cells or after digestion of the cells, for example using ultrasound or lysozyme.

20 For example, the method is applicable to detecting epoxide hydrolase in bacteria of the genus *Streptomyces*.

25 Preferably, the detection method is carried out in such a manner that a sample is withdrawn from a freshly taken culture of the microorganism, this is disrupted, freed from cell fragments and an epoxide comprising a substrate for the enzyme to be tested is added and mixed. If required, the reaction conditions can be optimized in the solution by customary measures, for example by adding buffer, adjusting the reaction temperature and the like. Preferably, to improve the solubility of the epoxide in the aqueous reaction medium, a cosolvent is used. Suitable cosolvents are, for example, dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), ethanol or acetone. Optimum reaction conditions for epoxide hydrolases from *Streptomyces* comprise:

Reaction medium: Sodium phosphate buffer pH
8.0, 0.1 M, 10% (v/v) DMSO
pH range: 6-8
Temperature: 30-37°C
5 Reaction time: 2-20 hours
Substrate concentration: from 0.1 to 0.8 molar

The substrate preferably used is styrene oxide,
3-phenylglycidate, hexane-1,2-oxide, decane-1,2-oxide
10 and/or indene oxide in enantiomerically pure form or as
enantiomeric mixture.

To develop the color reaction, the pH is then adjusted
by adding a base, for example triethylamine. NBP is
15 then added, for example at a concentration in the range
from about 3 to 10%, preferably about 5% (w/v) in
methoxyethanol. As solubilizer for the pigment formed,
for example, triethylene glycol dimethyl ether is added
in sufficient quantity. The solution is finally
20 incubated at from about 35 to 45°C, preferably 39°C,
and the absorption is then determined at 560 nm,
preferably against a reference at 650 nm. From
comparison with an enzyme-free control solution, the
decrease in absorption and thus the decrease in epoxide
25 can be determined quantitatively.

The invention also relates to screening methods for
detecting microorganisms having epoxide hydrolase
activity and/or having the ability to hydrolyze
30 epoxides enantioselectively, comprising the above
described detection method. This is particularly
suitable for systematic study of strain collections or
mutant banks, generated by "directed evolution", for
epoxide hydrolase activity.

35

We have found that the above third object was achieved,
surprisingly, by providing a process for separating
epoxide enantiomer mixtures which comprises

- a) incubating an epoxide enantiomer mixture, which comprises an epoxide hydrolase substrate, with an inventive epoxide hydrolase, a microorganism of the genus *Streptomyces*, an epoxide-hydrolase-containing homogenate thereof or a fraction of this homogenate under reaction conditions;
- b) reacting the enantiomer mixture, preferably to achieve a 50% conversion rate; and
- c) separating the enantiomer remaining in the reaction mixture from the conversion product and purifying the essentially enantiomerically pure reaction product and/or the essentially enantiomerically pure starting material remaining.

Preferably, enantiomer mixtures of one of the following epoxides is converted: styrene oxide, 3-phenylglycidate, hexane-1,2-oxide, decane-1,2-oxide and indene oxide or substituted analogs of these oxides in accordance with the above definition.

The invention further relates to a process for producing epoxide hydrolases (E.C. 3.3.2.3), which comprises

- a) producing a cell homogenate from a culture of a microorganism of the genus *Streptomyces*;
- b) fractionating the homogenate, the resultant fractions being tested for epoxide hydrolase activity, preferably using a detection method based on the color reaction of unreacted epoxide with NBP according to the above definition; and
- c) combining fractions having epoxide hydrolase activity and if appropriate further fractionating.

The invention finally relates to the use of an

inventive epoxide hydrolase, a microorganism of the genus *Streptomyces*, an epoxidehydrolase-containing homogenate thereof or a fraction of this homogenate for the enantioselective hydrolysis of epoxides.

5

The invention is described in more detail by the examples below and with reference to the accompanying figures. In the drawings:

10 Figure 1 shows results of measurements of pigment formation from NBP and epoxide at various styrene oxide concentrations. The change in absorption in solutions in the presence of *E.coli* DH5a by the NBP assay (black circles),
15 without *E.coli* DH5a cell and without NBP (black squares) and with cell lysate of *E.coli* DH5a by the NPB assay (black triangles) are plotted, in each case after 45 minutes at the specified styrene oxide
20 concentrations.

Figure 2 shows the time course of racemate resolution of styrene oxide by the epoxide hydrolase from *S. antibioticus* Tü4 (DSM 12925). ee[%] (R)-styrene oxide (black squares); ee[%] (S)-phenyl-1,2-ethanediol (black circles);
25 conversion rate [%] (black triangles);

Figure 3 shows the effect of various cosolvents on the hydrolysis of styrene oxide by epoxide
30 hydrolase from *S. antibioticus* Tü4 (DSM 12925); ee[%] (R)-styrene oxide is plotted as a function of cosolvent concentration (%(v/v)); acetone (black squares); DMSO (black circles); DMF (black
35 triangles).

Example 1: Validation of a test system for epoxide hydrolase

a) Styrene oxide as substrate

An epoxide hydrolase-free organism (E.coli DH5a) was cultured in 2 ml cultures and disrupted. 100 μ l
5 aliquots of the resultant cell lysates were distributed over 4 recesses of a microtitre plate. To the cell lysate was added 50 μ l of acetone containing various amounts of styrene oxide (1.3 mol/l (stock solution), 0.65 mol/l, 0.32 mol/l, 0.16 mol/l, 0.08 mol/l). The
10 solution was incubated at 30°C for 2 hours. After adding 25 μ l of triethylamine (TE), 50 μ l of p-nitrobenzylpyridine (NBP, 5% by volume) and 50 μ l of triethylene glycol dimethyl ether, it was again incubated at 39°C for 45 minutes and then the
15 absorption was measured at 560 nm against a reference of 650 nm.

The results are shown in Figure 1. The absorption increased linearly with the amount of styrene oxide
20 used. Therefore, the decrease in absorption indicates the presence of an epoxide hydrolase activity.

b) 3-Phenylglycidate as substrate

25 Example 1a) was repeated, except that the substrate used was 3-phenylglycidate. In this case also, there was a linear relationship between absorption and the remaining amount of unhydrolyzed epoxide.

30 c) Hexane-1,2-oxide as substrate

Example 1a) was repeated, except that the substrate used was hexane-1,2-oxide. In this case also there was a linear relationship between absorption and the
35 remaining amount of unhydrolyzed epoxide.

d) Indene oxide as substrate

Example 1a) was repeated, except that the substrate

used was indene oxide. In this case also there was a linear relationship between absorption and the remaining amount of unhydrolyzed epoxide.

- 5 Example 2: Screening various *Streptomyces* strains for epoxide hydrolase activity using styrene oxide as substrate

10 In a similar manner to Example 1, various deposited *Streptomyces* strains were tested, and also, as negative control, a bacterial strain of the genus *Rhodococcus* sp. (NCIMB 11216). The microtitre plate wells which contained the negative control exhibited an intensive color reaction (blue coloration), whereas in wells
15 containing *Streptomyces antibioticus* Tü4 (DSM 12925) and *Streptomyces fradiae* Tü27 (DSM 12131) the highest epoxide hydrolase activity was found (results not shown).

- 20 Example 3: Culturing the strain *Streptomyces antibioticus* Tü4

The organism was cultured both in 250 ml shake flasks and in a 30 l fermenter; the pH was not monitored.

- 25 a) 250 ml fermentation: the culture time at 30°C on the 250 ml scale was from 48 to 72 hours.
- 30 b) 30 l fermentation: 2 shake flasks each containing 1 l of malt medium [10 g of malt extract, 4 g of yeast, made up to 1 l with tap water and autoclaved, sterile-filtered glucose (4 g/l final concentration) was added after autoclaving] were inoculated with spores of *Streptomyces*
35 *antibioticus* Tü4; the cultures were then shaken for 48 hours (30°C, 210 rpm). 2 l of this preliminary culture were used to inoculate 20 l of malt medium (addition of 0.5 l of 20% strength by weight glucose solution to 20 l of malt

extract/yeast solution), prior homogenization (glass homogenizer, Braun Chemie) being recommended for colony growth as disperse as possible. The culture was stirred for 24 hours at 30°C in the 30 l fermenter (17 l/min of O₂, 200 rpm), then the fermentation was terminated. The cells were centrifuged off at 4000 rpm for 30 minutes and washed with TE buffer (pH 7.3, 1 mmol/l of EDTA). The moist biomass was 318 g. The cells were resuspended in 400 ml of TE buffer (pH 7.3, 1 mmol/l of EDTA).

Example 4: Enrichment of epoxide hydrolase from *S. antibioticus* Tü4

a) Cell disruption:

For the experiments with disrupted cells, the cultured cells were removed by filtration or centrifugation and washed twice with phosphate buffer (0.1 mol/l of NaCl, 10 mmol/l of EDTA). A suspension (10% w/v) was then prepared in the same buffer additionally containing 10 mg/ml of lysozyme. The suspension was incubated for 1 hour at 30°C and then disrupted twice for 5 minutes each time, with 1 minute in between, with ultrasound (Branson Sonifier W250, output 80W) in an ice bath. The resultant solution was centrifuged off for 60 minutes at 32 500 g and filtered (0.22 mm Sterivex-GP filter, Millipore)

b) Cell extract workup

A column packed with an anion exchanger (Super Q 650M, Toso Haas, 60 mol volume) was equilibrated with 25 ml of tris/HCl buffer (pH 8.1), and then 15 ml of the crude extract were applied. The column was eluted with 2 mol/l NaCl solution containing the following gradients:

1st gradient: 30 ml NaCl solution (0 - 12% by weight),
2nd gradient: 60 ml NaCl solution (12 - 35% by weight),

Wash with 25 ml NaCl solution (100% by weight),
5 reequilibration with 60 ml of tris/HCl buffer.

Flow rate: 4 ml/min, fraction size 4 ml. Protein was determined at 280 nm.

10 Activity of the individual fractions was determined using the NBP assay. For this, 150 μ l from the fractions were added to the wells of a 96-well microtitre plate and the NBP assay was performed as described above using the Biomek 2000 pipetting robot.
15 50 μ l of acetone solution containing styrene oxide (2.6 mol/l) were used in order to reduce the amount of acetone, since the addition of acetone in an amount which is relatively too large can lead to a decrease in enzyme activity. The rest of the experimental procedure
20 was performed in a similar manner to the procedure described above. In the enrichment, all of the epoxide hydrolase activity was detected in one fraction.

Example 5: Conversion of styrene oxide using epoxide
25 hydrolase from *S. antibioticus* Tü4

a) Reaction procedure

500 μ g of styrene oxide were added to 250 ml of the
30 cell-free extract from Example 4 containing 12.5 ml of DMSO as solubilizer. The mixture was incubated at 30°C with uniform shaking (250 rpm).

After 24 hours, the reaction was terminated by adding
35 30 ml of ethyl acetate, and the aqueous phase was extracted. The organic phase was concentrated under reduced pressure. Gas-chromatographic analysis found an enantiomeric excess of the substrate of (ee_s [%]) of 100 and of the product (ee_p [%]) of 14.

The enantiomeric purity of a chiral substance, which occurs in (R)- and (S) forms, is expressed by the parameter ee (enantiomeric excess). This is defined by the following equation:

5

$$ee[\%] = [(X_A - X_B) / (X_A + X_B)] * 100$$

where X_A and X_B are the molar fraction of enantiomer A and B, respectively.

10

The enantiomeric excesses were analyzed by chiral gas chromatography under the following conditions: 75°C isothermal, 130 kPa, on an FS-Cyclodex β -I/P CS-fused silica capillary column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) (H_2 carrier gas, split 1:100, 0.25 mm \times 50 mm).

15

The product phenyl-1,-2-ethanediol was analyzed under the following conditions: 140°C isothermal under otherwise identical conditions.

20

The enantioselectivity E of an enzymatic reaction is a constant for an enzyme which is independent of substrate concentration and conversion rate and, for an irreversible reaction without product inhibition, may be calculated using the following formula:

25

$$\begin{aligned} E &= (V_{\max}/K_m)_{(R)\text{-Enantiomer}} / (V_{\max}/K_m)_{(S)\text{-Enantiomer}} = \\ &= \{\ln(1-U)(1-ee_s)\} / \{\ln[(1-U)(1+ee_s)]\} \\ 30 \quad &= \{\ln[(1-U)(1+ee_p)]\} / \{\ln[(1-U)(1-ee_p)]\} \end{aligned}$$

30

where ee_s is the enantiomeric excess of the substrate and ee_p is the enantiomeric excess of the product and the conversion rate U may be calculated from the formula $U = ee_s / (ee_s + ee_p)$.

35

Evaluation was performed as described by Chen, C.S. et al., (1982) J.Am.Chem.Soc. 104, 7294.

b) Determination of enantioselectivity

To follow the course of the reaction, 1.5 ml lots of the cell-free extract were shaken with 75 ml of DMSO and 7 ml of styrene oxide in sealable 2 ml reaction vessels at 30°C and extracted with 300 ml of ethyl acetate at predetermined times.

Table 1 shows the results.

Table 1:

| Time [h] | ee _s [%] | ee _p [%] | Conversion rate [%] |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 0.5 | - | - | - |
| 1 | 11 | 66 | 15 |
| 3.5 | 23 | 26 | 47 |
| 5 | 33 | 22 | 59 |
| 7 | 91 | 21 | 82 |
| 24 | 100 | 14 | 87 |

The time course of the reaction is shown in the accompanying Figure 2.

Example 6: Hydrolysis of styrene oxide by *Streptomyces* strains *S. fradiae* Tü 27 and *S. arenae* Tü495

Whole cells of a 250 ml culture of the organism were resuspended in 200 ml of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8). To this were added 500 µl of styrene oxide and 10% (v/v) of DMSO. The reaction solution was shaken at 30°C at 210 rpm in a closed conical flask. Samples (1.5 ml) were taken at various time intervals to monitor the course of the reaction, centrifuged at 14000 rpm for 3 minutes and extracted with 300 µl of diethyl ether. The organic phases were dried using anhydrous sodium sulfate and analyzed by gas chromatography to determine the enantiomeric excess, the conversion rate and the enantioselectivity as described above. The results are summarized in Table 2 below:

Table 2:

| Strain | Enantiomeric excess | | Conversion rate | Time |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|------|
| | ee _s ^a [%] | ee _p ^b [%] | [%] | [h] |
| Tü27 | 70 | 23 | 75 | 48 |
| Tü95 | 52 | 38 | 60 | 24 |

^a (R)-Styrene oxide

^b (S)-Phenyl-1,2-ethanediol

5 Example 7: Effect of cosolvents on styrene oxide hydrolysis.

Example 6 was repeated, but *S. antibioticus* Tü4 was used as the microorganism, and DMSO, DMF or acetone were added to the reaction solutions in various amounts. The results are shown in Figure 3. 10% DMSO, 5% acetone and 1-3% DMF led to an increase in enantiomeric excess, and thus in enantioselectivity.

15 Example 7: Hydrolysis of ethyl 3-phenylglycidate (3-PEG) and n-decane-1,2-oxide by epoxide hydrolase from *S. antibioticus* Tü4

Example 5 was repeated, but instead of styrene oxide, 3-PEG or n-decane-1,2-oxide was used as substrate.

a) Conversion of 3-PEG:

In contrast to Example 5, 3-PEG was analyzed gas-chromatographically at 60kPa, 130°C (60 min), 180°C (5 min), 10°C/min

b) Conversion of decane-1,2-oxide

The decane-1,2-diol formed was derivatized with acetone and p-toluenesulfonic acid as catalyst in ethyl acetate. Isopropylidenedecane-1,2-diol was analyzed at 120°C under the conditions specified in Example 5.

We claim:

1. An epoxide hydrolase (E.C. 3.3.2.3) from a microorganism of the genus *Streptomyces*.
5
2. An epoxide hydrolase as claimed in claim 1, having at least one of the following properties:
 - 10 a) hydrolytic epoxide cleavage of a styrene oxide and of at least one other compound selected from ethyl 3-phenylglycidates, n-hexane-1,2-oxides, n-decane-1,2-oxides and indene oxides;
 - 15 b) conversion of a racemate of styrene oxide with an enantioselectivity $E \geq 2$ to give (S)-phenyl-1,2-ethanol.
- 20 3. An epoxide hydrolase isolated from bacteria of the genus *Streptomyces*, in particular from the species *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* and *S. fradiae*, preferably from the strains *Streptomyces griseus* (DSM 40236 and DSM 13447), *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 40444 and DSM
25 13448), *Streptomyces antibioticus* Tü4 (DSM 12925) *Streptomyces arenae* Tü495 (DSM 40737 and DSM 12134) or *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131).
- 30 4. A *Streptomyces antibioticus* Tü4 deposited at the DSMZ under the Deposit Number DSM 12925.
5. A process for separating epoxide enantiomer mixtures, which comprises
 - 35 a) incubating an epoxide enantiomer mixture, which comprises an epoxide hydrolase substrate, with an epoxide hydrolase as claimed in one of claims 1 to 3, a microorganism of the genus *Streptomyces*, an epoxide hydrolase-containing

homogenate thereof, or a fraction of this homogenate;

5 b) converting the enantiomeric mixture, preferably until the reaction equilibrium is established; and

c) fractionating the reaction mixture.

10 6. A process as claimed in claim 5, wherein an enantiomeric mixture of an epoxide is converted, which mixture is selected from styrene oxides, 3-phenylglycidates, hexane-1,2-oxides, decane-1,2-oxides and indene oxides.

15 7. A detection method for epoxide hydrolase, which comprises

20 a) incubating an analyte in which epoxide hydrolase activity is suspected with an epoxide-containing substrate for the epoxide hydrolase under reaction conditions;

25 b) carrying out a color reaction with unreacted epoxide in the presence of 4-nitro-benzylpyridine (NBP); and

30 c) analyzing the solution from step b) for decrease in pigment concentration, relative to an epoxide hydrolase-free control solution.

35 8. A method as claimed in claim 7, wherein the relative decrease in pigment concentration is determined quantitatively and the epoxide hydrolase activity in the analyte is determined therefrom.

9. A method as claimed in claim 8, wherein the analyte is a microorganism, a homogenate therefrom

or a fraction of this homogenate.

10. A process as claimed in claim 9, wherein the
microorganism is a bacterium of the genus
Streptomyces.
11. A method as claimed in one of claims 7 to 10,
wherein the epoxide-containing substrate is
styrene oxide, 3-phenylglycidate, hexane-1,2-oxide
and/or indene oxide in enantiomeric pure form or
an enantiomeric mixture.
12. A screening method for detecting microorganisms
having epoxide hydrolase activity and/or having
the ability for the enantioselective hydrolysis of
epoxides, comprising a detection method as claimed
in one of claims 7 to 11.
13. The use of an epoxide hydrolase as claimed in one
of claims 1 to 3, a microorganism of the genus
Streptomyces, an epoxide-hydrolase-containing
homogenate thereof or a fraction of this
homogenate for the enantioselective hydrolysis of
epoxides.
14. The use of an epoxide hydrolase as claimed in one
of claims 1 to 3, a microorganism of the genus
Streptomyces., an epoxide-hydrolase-containing
homogenate thereof or a fraction of this
homogenate for the enantioselective preparation of
hydroxides from the corresponding epoxides.
15. A process for producing epoxide hydrolases
(E.C. 3.3.2.3), wherein
 - a) a cell homogenate is produced from a culture of
a microorganism of the genus Streptomyces;
 - b) the homogenate is fractionated, the resultant

fractions being tested for epoxide hydrolase activity, if appropriate using a detection method as claimed in one of claims 7 to 11; and

- 5 c) fractions having epoxide hydrolase activity are combined and if appropriate further fractionated.

Abstract

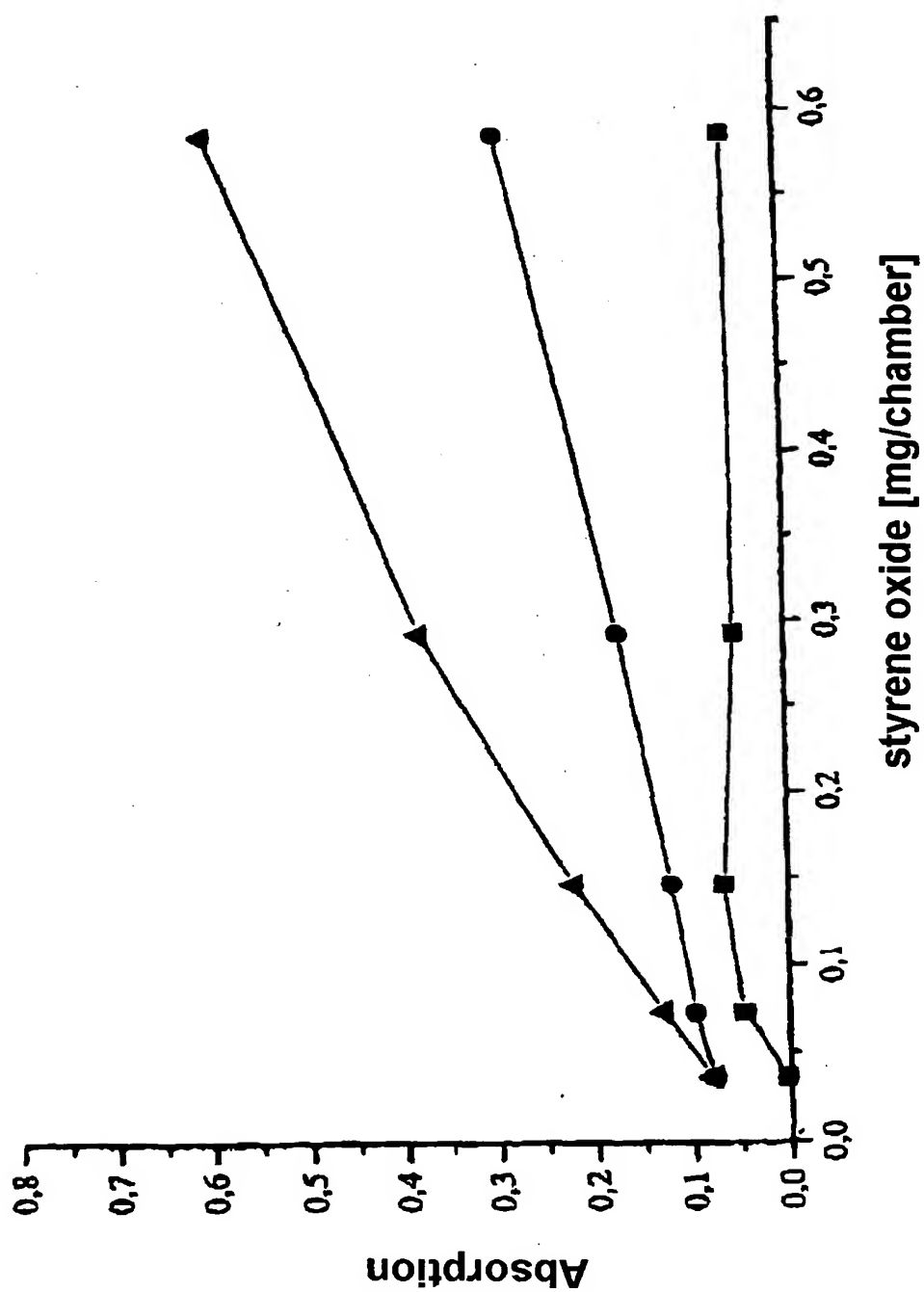
Epoxide hydrolases from Streptomyces

- 5 A description is given of epoxide hydrolases from
bacteria of the genus Streptomyces, a novel process for
the enzymatic separation of epoxide enantiomeric
mixtures, of a novel detection method for epoxide
hydrolase activity, a screening method for detecting
10 epoxide hydrolase activity and the use of bacteria of
the genus Streptomyces and of the resultant epoxide
hydrolases for enantioselective epoxide hydrolysis.



1/3

Fig.1



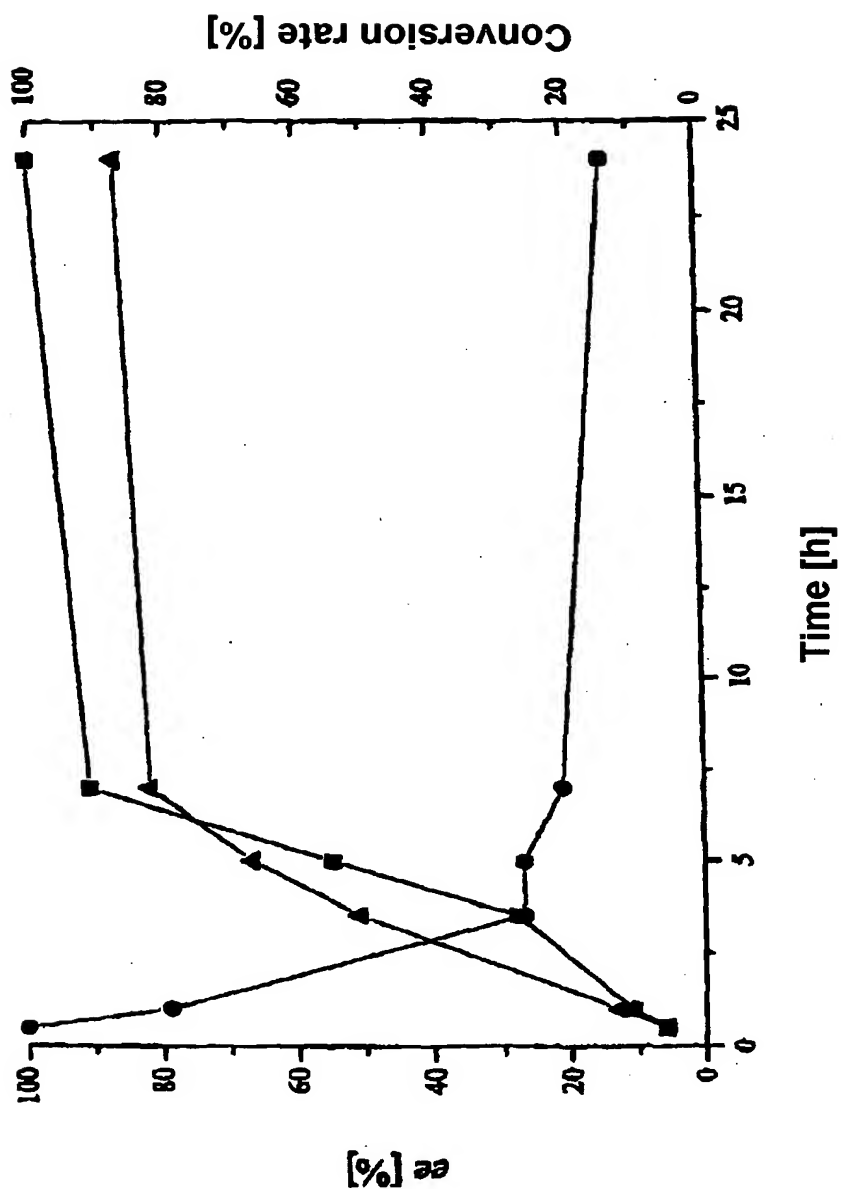


Fig. 2

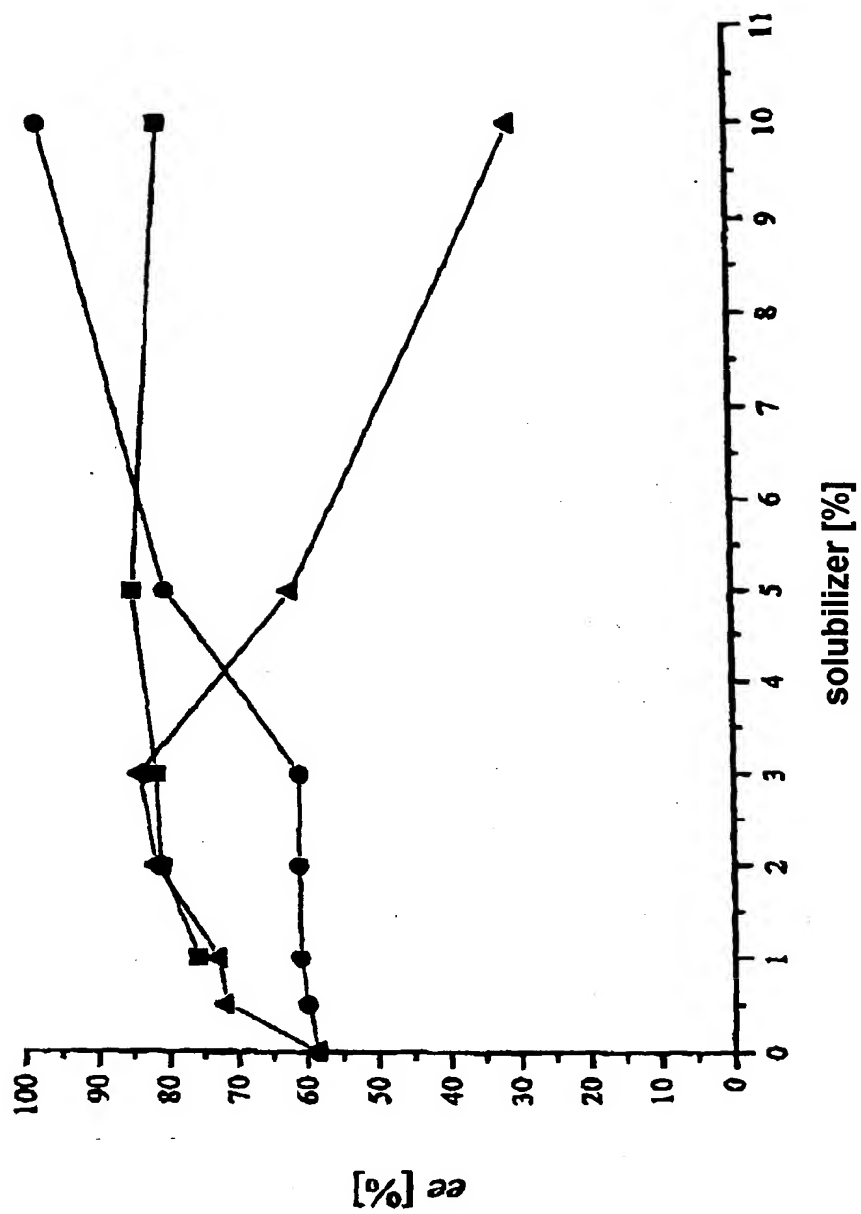
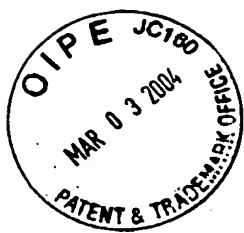


Fig. 3

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 35 113.9 /

Anmeldetag: 27. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Epoxidhydrolasen aus Streptomyces

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Dzierzon



Epoxidhydrolasen aus Streptomyces

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft verbesserte Epoxidhydrolasen, welche aus Bakterien der Gattung Streptomyces sp. isolierbar sind, ein neues Verfahren zur enzymatischen Trennung von Epoxid-Enantiomergemischen, ein neuartiges Nachweisverfahren für Epoxidhydrolaseaktivität, ein Screening-Verfahren zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität und die Verwendung von Bakterien der Gattung Streptomyces sp. und der daraus gewonnenen Epoxidhydrolasen zur enantioselektiven Epoxidhydrolyse.

10

Die zunehmende Bedeutung enantiomerenreiner Verbindungen vor allem in der pharmazeutischen und der agrochemischen Industrie erfordert einen sicheren und wirtschaftlichen Zugang zu optisch aktiven Substanzen. Für die Darstellung von enantiomerenreinen Diolen und Epoxiden steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung:

20

Bei der asymmetrischen chemischen Synthese von Epoxiden geht man von einer prochiralen Verbindung aus. Durch Verwendung eines chiralen Reagens, beispielsweise einer chiralen Persäure, eines chiralen Dioxirans bzw. Oxaziridins oder eines chiralen Bo-rats, eines chiralen Auxiliars oder eines chiralen, metallischen oder nicht-metallischen, Katalysators wird ein chirales Epoxid gebildet. Der bekannteste Weg zur Darstellung chiraler Epoxide ist die Sharpless-Epoxidierung von Alkenolen, z.B. von Allylalkoholen, mit Hydroperoxiden in Gegenwart von Übergangsmetallkatalysatoren.

30

Auch die Herstellung von enantiomerenreinen Diolen auf biochemischem Weg ist bekannt. Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität katalysieren die regio- und enantiospezifische Hydrolyse von Epoxiden. Sie spalten die Etherbindung in Epoxiden unter Bildung von Diolen. Es wurden bereits einige Bakterienstämme beschrieben, die es ermöglichen, eine breite Auswahl an racemischen Epoxiden enantioselektiv zu hydrolysieren. Die Zahl der bekannten Epoxidhydrolasen und ihre Anwendung für die organische Synthese ist jedoch bis-lang begrenzt. Bekannte Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität sind beispielsweise Aspergillus niger LCP521, Bacillus sulfurescens ATCC 7159, Rhodococcus species NCIMB 11216 und andere.

35

40

45 NAE 167/99 UP/58 26.07.1999

Die bekannten Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität weisen jedoch oft ein begrenztes Substratspektrum und geringe Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Auch sind die mit diesen Stämmen erreichbaren Enantioselektivitäten vielfach zu gering [Grogan, G., et al., 5 FEMS Microbiology Lett. 141 (1996), 239 - 243; Kroutil, W., et al., Tetrahedron Lett. (1996), 8379 - 8382]. Die bekannten Stämme sind genetisch schlecht zugänglich und teilweise schwierig kultivierbar. Deshalb liegen bisher nur zwei Ep-oxidhydrolasen [Corynebacterium sp. C12, (Misawa, E., et al., Eur.J.Biochem. 253 10 (1998), 173 - 183) und Agrobacterium radiobacter AD1 (Rink, R., et al., J.Biol.Chem. 272 (1997), 14650 - 14657)] rekombinant in E.coli vor. Auch die Reinigung der aus den Mikroorganismen erhaltenen Epoxidhydrolasen wurde bisher nur bei Rhodococcus species NCIMB 11216 [Faber, K., et al., Biotechnology Lett. 17 (1995), 15 893 - 898] und Norcardia EH 1 [Kroutil, W., et al J. Biotechnol. 61 (1998), 143 - 150] beschrieben. Sie war in beiden Fällen sehr aufwendig. Die Anreicherung von Epoxidhydrolase aus Corynebacterium sp. C12 wird von Misawa, E., et al., Eur. J. Biochem. 253, (1998) 173-183 beschrieben.

20 Zusätzlich erschwert wird die Suche nach neuen epoxidhydrolasehaltigen Mikroorganismen dadurch, daß das Screening, d.h. die systematische Suche, nach neuen Epoxidhydrolase produzierenden Mikroorganismen, z.B. in mikrobiologischen Stammsammlungen, bisher 25 sehr zeitaufwendig war. Dies liegt daran, daß zum Screening üblicherweise Verfahren eingesetzt werden, bei denen die einzelnen Ansätze aufgearbeitet und einzeln gas- bzw. flüssigkeitschromatographisch untersucht werden müssen.

30 Eine erste Aufgabe der Erfindung war es daher, neue Epoxidhydrolasen mit erweitertem Substratspektrum und/oder verbesserter Reaktivität und/oder verbesserter Enantioselektivität bereitzustellen. Außerdem sollten die neuen Epoxidhydrolasen insbesondere dadurch besser zugänglich sein, daß sie aus nicht-pathogenen, 35 leicht kultivierbaren Organismen isolierbar sind und außerdem eine gute molekularbiologische Zugänglichkeit aufweisen.

Eine zweite Aufgabe der Erfindung war die Bereitstellung eines Verfahrens zum schnelleren und einfacheren Nachweis von Epoxidhy- 40 drolase, was auch ein verbessertes Screening auf Epoxidhydrolase produzierende Mikroorganismen ermöglichen sollte.

Eine dritte Aufgabe der Erfindung war die Bereitstellung eines verbesserten biochemischen Verfahrens zur Trennung von Epoxid- 45 Enantiomerengemischen und damit eines verbesserten Verfahrens zur enantioselektiven Umsetzung von Epoxiden, das einen einfacheren

5

3

Zugang zur enantiomerenreinen Diolen und/oder Epoxiden ermöglicht.

Eine vierte Aufgabe der Erfindung bestand darin, neue Epoxidhydro-
5 drolase produzierende Mikroorganismen bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde obige erste Aufgabe gelöst durch Bereitstellung von Epoxidhydrolasen (E.C. 3.3.2.3) aus Mikroorganismen der Gattung Streptomyces sp. Epoxidhydrolase-Aktivität
10 wurde in Mikroorganismen dieser Gattung bisher nicht beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Epoxidhydrolasen besitzen wenigstens eine der folgenden vorteilhaften Eigenschaften im Vergleich zu bisher bekannten Epoxidhydrolasen:

15

- verbesserte Enantioselektivität bei der Spaltung von enantiomerer Epoxide;
- verbessertes (erweitertes) Substratspektrum;
- verbesserte Reaktivität;
- 20 - bessere molekularbiologische Zugänglichkeit;
- bessere biochemische Zugänglichkeit aufgrund leichter Kultivierbarkeit der Mikroorganismen.

Eine "verbesserte Enantioselektivität" im Sinne der Erfindung ist
25 gegeben, wenn bei im wesentlichen gleichem Umsatz ein höherer Enantiomerenüberschuß erzielbar ist.

Ein "erweitertes Substratspektrum" in Sinne der Erfindung bedeutet, daß racemische Gemische mehrerer Epoxide umgesetzt werden.

30

Eine "verbesserte Reaktivität" im Sinne der Erfindung bedeutet, daß die Umsetzung mit höherer Raum-Zeit-Ausbeute erfolgt.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere solche Epoxidhydrolasen aus Streptomyces, die wenigstens eine der folgenden Eigenschaften aufweisen:

- 35
- a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, wie z.B. Styroloxid oder eines am Phenylring oder Epoxidring ein- oder
40 mehrfach substituierten Derivats davon, wie insbesondere einem in meta- oder para-Stellung durch Nitro oder Halogen, insbesondere Chlor oder Brom, monosubstituierten Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidat, n-He-xan-1,2-oxid, n-De-
45 can-1,2-oxid und Indenoxid, welche gegebenenfalls ein- oder

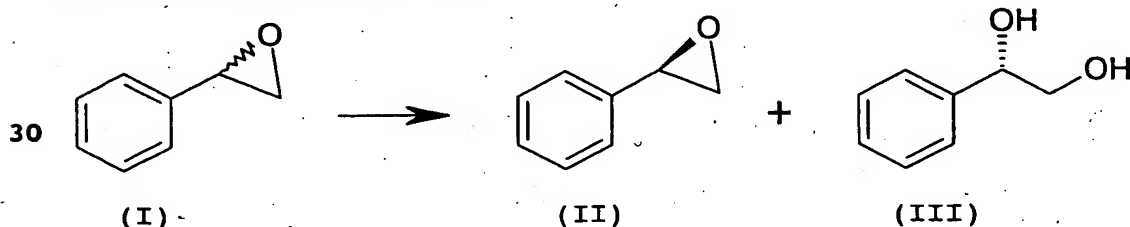
mehrfach durch Substituenten, vorzugsweise gemäß obiger Definition, substituiert sein können;

- b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantioselectivität $E \geq 2$, wie z.B. ≥ 10 , wie etwa 10 bis 100, zu (S)-Phenyl-1,2-ethanol gemäß der im folgenden angegebenen Reaktionsgleichung (A), wobei diese Umsetzung mit ganzen Zellen oder einem Zellhomogenat oder einem angereicherten oder gereinigten Enzympräparat durchführbar ist und bevorzugt in Gegenwart eines Cosolvens, wie 5 bis 10% (v/v) DMSO erfolgt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden Epoxidhydrolasen bereitgestellt, welche aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp., insbesondere aus der Art *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* und *S. fradiae*, vorzugsweise aus den Stämmen *Streptomyces griseus* (DSM 40236), *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 40444), *Streptomyces arenae* Tü 495 (DSM 40737), *Streptomyces antibioticus* Tü 4 (DSM 12925) oder *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131) isolierbar sind.

Besonders bevorzugt ist die aus *Streptomyces antibioticus* Tü 4 (DSM 12925) isolierbare Epoxidhydrolase. Dieses Enzym ist durch seine ausgeprägte Enantioselectivität bei der Umsetzung von (R/S)-Styroloxid (I) gemäß folgender Reaktionsgleichung (A)

Reaktionsgleichung (A):



zu (S)-Phenyl-1,2-ethandiol (III) unter Nicht-Hydrolyse von (R)-Styroloxid (II) charakterisiert. So katalysiert dieses Enzym in einem Reaktionsmedium, enthaltend 10 % (v/v) DMSO als Lösungsvermittler, obige Umsetzung unter einer Enantioselectivität von $E = 13$ und einem Enantiomerenüberschuß $ee[\%] = 99$ für (II) und $ee[\%] = 14$ für (III).

Die Isolierung des Enzyms wird in den Ausführungsbeispielen näher beschrieben. Soweit keine näheren Angaben gemacht werden, erfolgt die Enzym-Anreicherung mit Hilfe biochemischer Standardverfahren, wie z.B. beschrieben von T.G. Cooper in Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, (1981).

5

Gegenstand der Erfindung ist außerdem einen neuer Streptomyces-Stamm mit der Bezeichnung Streptomyces antibioticus Tü 4, hinterlegt bei der DSMZ unter der Hinterlegungsnummer DSM 12925 und Varianten und Mutanten dieses Stammes.

5

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls funktionale Analoga der erfindungsgemäß bereitgestellten Enzyme, wie Varianten, Allele und Mutanten, welche Epoxidhydrolase-Aktivität besitzen und, vorzugsweise, wenigstens eine der obengenannten vorteilhaften Eigen-

10 schaften aufweisen.

Obige zweite Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Bereitstellung eines optischen Nachweisverfahrens für Epoxidhydrolase, wobei man

15

a) einen Analyten, z.B. eine Mikroorganismenkultur, in welchen man Epoxidhydrolaseaktivität vermutet, mit einem epoxidhaltigen Substrat für die Epoxidhydrolase unter Reaktionsbedingungen inkubiert;

20

b) nicht umgesetztes Epoxid mit 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) unter Bildung eines bei 560nm absorbierenden Farbstoffs chemisch umgesetzt; und

25 c) den Ansatz aus Schritt b) auf Abnahme der Farbstoffkonzentration, relativ zu einem Epoxidhydrolase-freien Kontrollansatz analysiert.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren ist qualitativ, z.B. als
30 Spotttest, oder quantitativ durchführbar. Beim quantitativen Verfahren bestimmt man zunächst quantitativ die relative Abnahme der Farbstoffkonzentration, z.B. photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 560 nm, und ermittelt daraus die Epoxidhydrolaseaktivität im Analyten.

35

Als Analyt sind grundsätzlich geeignet Mikroorganismen per se, wie z.B. Proben aus einer frisch gezogenen Kultur eines Bakteriums, Zellhomogenisate davon oder Fraktionen dieser Zellhomogenisate nach einer Aufreinigung. Vorzugsweise wird der Test mit gan-
40 zen Zellen oder nach Aufschluß der Zellen, z.B. mit Ultraschall oder Lysozym, durchgeführt.

Beispielsweise ist das Verfahren anwendbar auf den Nachweis von Epoxidhydrolase in Bakterien aus der Gattung Streptomyces.

45

8

6

Vorzugsweise wird das Nachweisverfahren so durchgeführt, daß man einer frisch gezogenen Kultur des Mikroorganismus eine Probe entnimmt, diese aufschließt, von Zellfragmenten befreit und mit einem Epoxid, welches ein Substrat für das zu testende Enzym um-

5 fasst, zugibt und mischt. Erforderlichenfalls kann man in dem Ansatz die Reaktionsbedingungen durch übliche Maßnahmen, wie z.B. durch Zugabe von Puffer, Einstellen der Reaktionstemperatur und dergleichen, optimieren. Bevorzugt verwendet man zur Verbesserung der Löslichkeit des Epoxids im wässrigen Reaktionsmedium ein Co-

10 solvens. Geeignete Cosolventien sind z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Ethanol oder Aceton. Optimale Reaktionsbedingungen für Epoxidhydrolasen aus Streptomyces umfassen:

- 15 Reaktionsmedium: Natriumphosphatpuffer pH 8,0, 0,1 M, 10% (v/v)
DMSO
pH-Bereich: 6-8
Temperatur: 30-37 °C
Reaktionsdauer: 2-20 Stunden
- 20 Substrat-
konzentration: 0,1 bis 0,8 molar

Vorzugsweise verwendet man als Substrat Styroloxid, 3-Phenylglycidat, Hexan-1,2-oxid, Decan-1,2-oxid und/oder Indenoxid in enantiomerenreiner Form oder als Enantiomerengemisch.

25

Zur Entwicklung der Farbreaktion wird anschließend der pH-Wert durch Zugabe einer Base, wie z.B. Triethylamin, eingestellt. Anschließend gibt man NBP, z.B. in einer Konzentration im Bereich

30 von etwa 3 bis 10, vorzugsweise etwa 5 % (w/v) in Methoxyethanol, hinzu. Als Lösungsvermittler für den gebildeten Farbstoff gibt man z.B. Triethylenglycoldimethylether in ausreichender Menge hinzu. Den Ansatz inkubiert man schließlich bei etwa 35 bis 45, vorzugsweise 39°C und bestimmt anschließend die Absorption bei

35 560 nm, vorzugsweise gegen eine Referenz bei 650 nm. Aus einem Vergleich mit einem enzymfreien Kontrollansatz kann man die Abnahme der Absorption und damit die Abnahme von Epoxid quantitativ bestimmen.

- 40 Gegenstand der Erfindung sind auch Screening-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität und/oder mit der Befähigung zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden, umfassend das oben beschriebene Nachweisverfahren. Dieses eignet sich besonders zur systematischen Untersuchung von Stammsammlun-
- 45 gen oder durch sog. "directed evolution" erzeugte Mutantenbanken auf Epoxidhydrolaseaktivität.

Obige dritte Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Trennung von Epoxid-Enantiomerengemischen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 5 a) ein Epoxid-Enantiomerengemisch, welches ein Epoxydhydrolase-Substrat umfasst, mit einer erfindungsgemäßen Epoxydhydrolase, einem Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., einem Epoxidhydrolase-haltigen Homogenat davon oder einer Fraktion dieses Homogenates unter Reaktionsbedingungen inkubiert;
- 10 b) das Enantiomerengemisch, vorzugsweise bis zum Erreichen von 50 %-igem Umsatz, umsetzt; und
- 15 c) das im Reaktionsgemisch verbleibende Enantiomer vom Umsetzungsprodukt trennt und das im wesentlichen enantiomerenreine Umsetzungsprodukt und/oder das verbleibende im wesentlichen enantiomerenreine Edukt reinigt.

- Vorzugsweise setzt man Enantiomerengemische eines der folgenden
- 20 Epoxide um: Styroloxid, 3-Phenylglycidat, He-xan-1,2-oxid, Decan-1,2-oxid und Indenoxid oder substituierte Analoga dieser Oxide gemäß obiger Definition.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur
- 25 Gewinnung von Epoxydhydrolasen (E.C. 3.3.2.3), dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. ein Zellhomogenat herstellt;
- 30 b) das Homogenat fraktioniert, wobei man die erhaltenen Fraktionen auf Epoxidhydrolase-Aktivität, vorzugsweise unter Anwendung eines Nachweisverfahrens basierend auf der Farbreaktion von unumgesetztem Epoxid mit NBP gemäß obiger Definition, testet; und
- 35 c) Fraktionen mit Epoxidhydrolase-Aktivität vereinigt und gegebenenfalls weiter fraktioniert.

- 40 Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Epoxidhydrolase, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden.

8

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele und unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

- 5 Figur 1 Meßergebnisse für die Farbstoffbildung aus NBP und Epoxid bei verschiedenen Styroloxidkonzentrationen. Aufgetragen ist die Absorptionsänderung in Ansätzen in Gegenwart von E. coli DH5a nach dem NBP-Assay (schwarze Kreise), ohne E. coli DH5a-Zelle und ohne NBP (schwarze Quadrate) und mit Zelllysate von E. coli DH5a nach NBP-Assay (schwarze Dreiecke), jeweils nach 45 Minuten bei den angegebenen Styroloxidkonzentrationen.

- 15 Figur 2 den zeitlichen Verlauf der Racematspaltung von Styroloxid durch die Epoxidhydrolase aus S. antibioticus Tü4 (DSM 12925). ee[%] (R)-Styroloxid (schwarze Quadrate); ee[%] (S)-Phenyl-1,2-ethandiol (schwarze Kreise); Umsatz[%] (schwarze Dreiecke);

- 20 Figur 3 den Einfluß verschiedener Cosolventien auf die Hydrolyse von Styroloxid durch Epoxidhydrolase aus S. antibioticus Tü4 (DSM 12925); aufgetragen ist ee[%] (R)-Styroloxid in Abhängigkeit von der Cosolvenskonzentration (%(v/v)); Aceton (schwarze Quadrate); DMSO (schwarze Kreise); DMF (schwarze Dreiecke).

Beispiel 1 : Validierung eines Testsystems für Epoxidhydrolase

a) Styroloxid als Substrat

- 30 Ein Epoxidhydrolase-freier Organismus (E. coli DH5a) wurden in 2 ml Kulturen kultiviert und aufgeschlossen. Jeweils 100 µl der erhaltenen Zellaufschlüsse wurden auf 4 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verteilt. Zu dem Zellaufschluß wurden 50 µl Aceton mit verschiedenen Styroloxidmengen (1,3 mol/l (Stamm-lösung), 0,65 mol/l, 0,32 mol/l, 0,16 mol/l, 0,08 mol/l) hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Triethylamin (TE), 50 µl p-Nitrobenzylpyridin (NBP, 5 Vol.-%) und 50 µl Triethylenglykoldimethylether wurde nochmals 45 Minuten bei 39°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm gegen eine Referenz bei 650 nm gemessen.

Die Ergebnisse sind in Figur 1 dargestellt. Die Absorption nahm linear zur eingesetzten Styrol-oxidmenge zu. Deshalb zeigt die Verringerung der Absorption das Vorhandensein einer Epoxidhydrolaseaktivität an.

b) 3-Phenylglycidat als Substrat

Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat 3-Phenylglycidat verwendet wurde. Auch hier fand sich eine
5 Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an nicht hydrolysiertem Epoxid.

c) Hexan-1,2-oxid als Substrat

10 Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat Hexan-1,2-oxid verwendet wurde. Auch hier fand sich eine Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an nicht hydrolysiertem Epoxid.

15 d) Indenoxid als Substrat

Beispiel 1a) wurde mit der Abänderung wiederholt, daß als Substrat Indenoxid verwendet wurde. Auch hier fand sich eine Linearität zwischen der Absorption und der verbleibenden Menge an
20 nicht hydrolysiertem Epoxid.

Beispiel 2: Screening verschiedener Streptomyces-Stämme auf Epoxidhydrolase-Aktivität mit Styroloxid als Substrat

25 Analog zu Beispiel 1 wurden verschiedene hinterlegte Streptomyces-Stämme sowie als negative Kontrolle ein Bakterienstamm der Gattung Rhodococcus sp. (NCIMB 11216) getestet. Diejenigen Vertiefungen der Mikrotiterplatte welche die negative Kontrolle enthielten zeigten eine intensive Farbreaktion (Blaufärbung) während
30 in Vertiefungen mit Streptomyces antibioticus Tü4 (DSM 12925) und Streptomyces fradiae Tü27 (DSM 12131) die höchste Epoxidhydrolase-Aktivität nachweisbar war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Beispiel 3: Kultivierung des Stammes Streptomyces antibioticus
35 Tü4

Die Kultivierungen wurden sowohl in 250 ml Schüttelkolben als auch in einem 30 l Fermenter durchgeführt, wobei der pH-Wert nicht kontrolliert wurde.

40

a) 250 ml Fermentation: Die Kultivierungsdauer betrug im 250 ml Maßstab zwischen 48 und 72 Stunden bei 30°C.

45 b) 30 l Fermentation: 2 Schüttelkolben mit je 1 l Malzmedium [10 g Malzextrakt, 4 g Hefe, auf 1 l mit Leitungswasser aufgefüllt und autoklaviert, sterilfiltrierte Glucose (4g/l Endkonzentration) wurde nach dem Autoklavieren hinzugegeben]

12

10

wurden mit Sporen von *Streptomyces antibioticus* Tü4 angeimpft; anschließend wurde 48 Stunden geschüttelt (30°C, 210 U/min). Mit 2 l dieser Vorkultur wurden 20 l Malzmedium (Zugabe von 0,5 l 20 gew.-%ige Glucoselösung zu 20 l Malzextrakt/Hefelösung) angeimpft, wobei sich für ein möglichst disperses Wachstum der Kolonie die vorherige Homogenisierung (Glashomogenisator, Braun Chemie) empfiehlt. Es wurde im 30 l-Fermenter bei 30°C 24 Stunden gerührt (17 l/min O₂, 200 U/min), dann wurde die Fermentation abgebrochen. Die Zellen wurden bei 4000 U/min 30 Minuten abzentrifugiert und mit TE-Puffer (pH 7,3, 1 mmol/l EDTA) gewaschen. Die Biofeuchtmasse betrug 318 g. Die Zellen wurden in 400 ml TE-Puffer (pH 7,3, mmol/l EDTA) resuspendiert.

15 Beispiel 4: Anreicherung Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4

a) Zellaufschluß:

20 Für die Versuche mit aufgeschlossenen Zellen wurden die kultivierten Zellen durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und zweimal mit Phosphatpuffer (0,1 mol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA) gewaschen. Anschließend wurde eine Suspension (10% w/v) im gleichen Puffer mit zusätzlich 10 mg/ml Lysozym hergestellt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend zweimal je 5 Minuten, dazwischen 1 Minute Pause, im Eisbad mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier W250, Output 80W). Die erhaltene Lösung wurde 60 Minuten bei 32 500 x g abzentrifugiert und filtriert (0,22mm Sterivex-GP Filter, Millipore).

30

b) Aufarbeitung des Zellextraktes

Eine mit einem Anionenaustauscher gefüllte Säule (Super Q 650M, Toso Haas, 60 ml Volumen) wurde mit 25 ml Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) äquilibriert, dann wurden 15 ml des Rohextraktes aufgebracht. Es wurde mit 2 mol/l NaCl-Lösung mit folgenden Gradienten eluiert:

1. Gradient: 30 ml NaCl-Lösung (0 - 12 Gew.-%),

40

2. Gradient: 60 ml NaCl-Lösung (12 - 35 Gew.-%),

Spülung mit 25 ml NaCl-Lösung (100 Gew.-%), Reäquilibrierung mit 60 ml Tris/HCl-Puffer.

45

11

Durchlauf: 4 ml/min, Fraktionsgröße 4 ml. Die Proteinbestimmung wurde bei 280 nm durchgeführt.

Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde mit dem NBP-Assay untersucht. Hierzu wurden 150 µl aus den Fraktionen in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gegeben und der NBP-Assay mit dem Biomex 2000 Pipettierroboter wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 50 µl Acetonlösung mit Styroloxid (2,6 mol/l) verwendet, um die Acetonmenge zu verkleinern, da die Zugabe von Aceton in einer relativ zu großen Menge zu einer Verringerung der Enzymaktivität führen kann. Die restliche Versuchsdurchführung erfolgte analog zu der vorstehend beschriebenen Vorgehensweise. In der Anreicherung konnte in einer Fraktion die gesamte Epoxidhydrolaseaktivität detektiert werden.

15

Beispiel 5: Umsetzung von Styroloxid mit Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* Tü4

a) Durchführung der Reaktion

20

Zu 250 ml des Zellaufschlusses aus Beispiel 4 mit 12,5 ml DMSO als Lösungsvermittler wurden 500 µg Styroloxid gegeben. Es wurde bei 30°C und gleichmäßigem Schütteln (250 U/min) inkubiert.

25 Nach 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Essigsäureethylester abgebrochen, und die wäßrige Phase wurde extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeeengt. Die gaschromatographische Analyse ergab einen Enantiomerenüberschuß des Substrats von (ee_S[%]) von 100 und des Produkts (ee_P[%]) von 14.

30

Die Enantiomerenreinheit einer chiralen Substanz, welche in (R)- und in (S)-Form auftritt, wird über den Parameter ee (Enantiomerenüberschuß) ausgedrückt. Dieser ist durch folgende allgemeine Gleichung definiert:

35

$$ee[\%] = [(X_A - X_B) / (X_A + X_B)] * 100$$

worin X_A und X_B für den Molenbruch von Enantiomer A bzw. B stehen.

40 Die Analyse der Enantiomerenüberschüsse erfolgte durch chirale Gaschromatographie unter folgenden Bedingungen: 75°C isotherm, 130 kPa, auf einer FS-Cyclodex B-I/P CS-Fused Silica Kapillarsäule (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) (H₂ Trägergas, Split 1:100, 0,25 mm x 50 mm).

45

12

Die Analyse des Produkts Phenyl-1,2-ethandiol erfolgte unter folgenden Bedingungen: 140°C isotherm unter ansonsten gleichen Bedingungen.

- 5 Die Enantioselektivität E einer enzymatischen Reaktion ist eine von Substratkonzentration und Umsatz unabhängige Konstante für ein Enzym und bei irreversibler Reaktion ohne Produktinhibition nach folgender Formel zu berechnen:

$$10 \quad E = (V_{\max}/K_m)_{(R)\text{-Enantiomer}} / (V_{\max}/K_m)_{(S)\text{-Enantiomer}} = \\ = \{ \ln[(1-U)(1-ee_s)] \} / \{ \ln[(1-U)(1+ee_s)] \} \\ = \{ \ln[(1-U)(1+ee_p)] \} / \{ \ln[(1-U)(1-ee_p)] \}$$

- 15 worin ee_s der Enantiomerenüberschuß des Substrats und ee_p der Enantiomerenüberschuß des Produkts ist und der Umsatz U nach der Formel $U = ee_s / (ee_s + ee_p)$ berechenbar ist.

Die Auswertung erfolgte gemäß Chen, C.S., et al., (1982) J.Am.Chem.Soc. 104, 7294.

20

b) Ermittlung der Enantioselektivität

- Für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurden 1,5 ml Ansätze des Zellaufschlusses mit 75 ml DMSO und 7 ml Styroloxid in ver-
25 schraubbaren 2 ml Reaktionsgefäßen bei 30°C geschüttelt und nach vorgegebenen Zeiten mit 300 ml Essigsäureethylester extrahiert. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 1:

| | | | | |
|----|----------|------------|------------|------------|
| 30 | Zeit [h] | ee_s [%] | ee_p [%] | Umsatz [%] |
| | 0,5 | - | - | - |
| | 1 | 11 | 66 | 15 |
| | 3,5 | 23 | 26 | 47 |
| 35 | 5 | 33 | 22 | 59 |
| | 7 | 91 | 21 | 82 |
| | 24 | 100 | 14 | 87 |

- 40 Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist in beiliegender Figur 2 dargestellt.

Beispiel 6: Hydrolyse von Styroloxid durch die Streptomyces-Stämme S. fradiae Tü27 und S. arenae Tü495

45

13

Ganze Zellen einer 250 ml Kultur des Organismus wurden in 200 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) resuspendiert. Dazu gab man 500 µl Styroloxid und 10% (v/v) DMSO. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C mit 210 Upm in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben geschüttelt. Proben (1,5 ml) wurden in verschiedenen Zeitintervallen zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs gezogen, bei 14000 Upm 3 Minuten zentrifugiert und mit 300 µl Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit wasserfreien Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses, des Umsatzes und der Enantioselektivität wie oben beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 2 zusammengefaßt:

Tabelle 2:

| Stamm | Enantiomerenüberschuß | | Umsatz | Dauer |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|--------|-------|
| | ee _s ^a [%] | ee _p ^b [%] | [%] | [h] |
| Tü27 | 70 | 23 | 75 | 48 |
| Tü495 | 52 | 38 | 60 | 24 |

^a (R)-Styroloxid

^b (S)-Phenyl-1,2-ethandiol

Beispiel 7: Einfluß von Cosolventien auf die Styroloxid-Hydrolyse.

Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch S. antibioticus Tü4 als Mikroorganismus verwendet wurde, und DMSO, DMF bzw. Aceton in verschiedenen Mengen zu den Reaktionsansätzen gegeben wurden. Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt. 10 % DMSO, 5 % Aceton und 1-3 % DMF führten zu einer Zunahme des Enantiomerenüberschusses und damit der Enantioselektivität.

Beispiel 7: Hydrolyse von 3-Penylethylglycidat (3-PEG) und n-Decan-1,2-oxid durch Epoxidhydrolase aus S. antibioticus Tü4

Beispiel 5 wurde wiederholt, wobei anstelle von Styroloxid 3-PEG bzw. n-Decan-1,2-oxid als Substrat eingesetzt wurde.

a) Umsetzung von 3-PEG:

Im Unterschied zu Beispiel 5 erfolgte die gaschromatographische Analyse von 3-PEG bei 60kPa, 130°C (60 min), 180°C (5 min), 10 °C/min

b) Umsetzung von Decan-1,2-oxid

Das gebildete Decan-1,2-diol wurde mit Aceton und p-Toluolsulfonsäure als Katalysator in Ethylacetat derivatisiert.

14

Isopropyliden-decan-1,2-diol wurde bei 120 °C unter den in
Beispiel 5 angegebenen Bedingungen analysiert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Epoxidhydrolase (E.C. 3.3.2.3) aus einem Mikroorganismus der
5 Gattung *Streptomyces* sp.
2. Epoxidhydrolase nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch wenigstens eine der folgenden Eigenschaften:
 - 10 a) hydrolytische Epoxidspaltung eines Styroloxids, und wenigstens einer weiteren Verbindung ausgewählt unter 3-Phenyl-ethylglycidaten, n-Hexan-1,2-oxiden, n-Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden;
 - 15 b) Umsetzung eines Racemats von Styroloxid mit einer Enantioselektivität $E > 2$ zu (S)-Phenyl-1,2-ethanol.
3. Epoxidhydrolase isoliert aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* sp., insbesondere aus der Art *S. griseus*, *S. thermovulgaris*, *S. antibioticus*, *S. arenae* und *S. fradiae*, vorzugsweise aus den Stämmen *Streptomyces griseus* (DSM 40236),
20 *Streptomyces thermovulgaris* (DSM 40444) *Streptomyces antibioticus* Tü 4 (DSM 12925), *Streptomyces arenae* Tü495 (DSM 40737) oder *Streptomyces fradiae* Tü 27 (DSM 12131).
- 25 4. *Streptomyces antibioticus* Tü 4 hinterlegt bei der DSMZ unter der Hinterlegungsnummer DSM 12925.
5. Verfahren zur Trennung von Epoxid-Enantiomerengemischen, dadurch gekennzeichnet, daß man
30
 - a) ein Epoxid-Enantiomerengemisch, welches ein Epoxidhydrolase-Substrat umfasst, mit einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Mikroorganismus der
35 Gattung *Streptomyces* sp., einem Epoxidhydrolase-haltigen Homogenat davon oder einer Fraktion dieses Homogenates inkubiert;
 - b) das Enantiomerengemisch, vorzugsweise bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes, umsetzt; und
40
 - c) das Reaktionsgemisch auftrennt.

2

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Enantiomerengemisch eines Epoxids umsetzt, das ausgewählt ist unter Styroloxiden, 3-Phenylglycidaten, Hexan-1,2-oxiden, Decan-1,2-oxiden und Indenoxiden.
- 5
7. Nachweisverfahren für Epoxidhydrolase, wobei man
- 10 a) einen Analyten, in welchen man Epoxidhydrolaseaktivität vermutet, mit einem epoxidhaltigen Substrat für die Epoxidhydrolase unter Reaktionsbedingungen inkubiert;
- b) mit nicht umgesetztem Epoxid in Anwesenheit von 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) eine Farbreaktion durchführt; und
- 15 c) den Ansatz aus Schritt b) auf Abnahme der Farbstoffkonzentration, relativ zu einem Epoxidhydrolase-freien Kontrollansatz analysiert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 20 die relative Abnahme der Farbstoffkonzentration quantitativ bestimmt und daraus die Epoxidhydrolaseaktivität im Analyten ermittelt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der
- 25 Analyt ein Mikroorganismus, ein Homogenat davon oder eine Fraktion dieses Homogenates ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der
- 30 Mikroorganismus ein Bakterium aus der Gattung Streptomyces sp. ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das epoxidhaltige Substrat Styroloxid, 3-Phenylglycidat, Hexan-1,2-oxid und/oder Indenoxid in enantiomerenreiner Form oder ein Enantiomerengemisch davon ist.
- 35
12. Screening-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität und/oder mit der Befähigung zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden, umfassend ein Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11.
- 40
13. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer
- 45 Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Hydrolyse von Epoxiden.

3

14. Verwendung einer Epoxidhydrolase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp., eines Epoxidhydrolase-haltigen Homogenates davon oder einer Fraktion dieses Homogenates zur enantioselektiven Herstellung von Hydroxiden aus den korrespondierenden Epoxiden.
15. Verfahren zur Gewinnung von Epoxydhydrolasen (E.C. 3.3.2.3), dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) aus einer Kultur eines Mikroorganismus der Gattung Streptomyces sp. ein Zellhomogenat herstellt;
 - b) das Homogenat fraktioniert, wobei man die erhaltenen Fraktionen auf Epoxidhydrolase-Aktivität, gegebenenfalls unter Anwendung eines Nachweisverfahrens gemäß einem der Ansprüche 7 bis 11, testet; und
 - c) Fraktionen mit Epoxidhydrolase-Aktivität vereinigt und gegebenenfalls weiter fraktioniert.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Epoxidhydrolasen aus Bakterien der Gattung
5 Streptomyces sp., ein neues Verfahren zur enzymatischen Trennung
von Epoxid-Enantiomerengemischen, ein neuartiges Nachweisverfah-
ren für Epoxidhydrolaseaktivität, ein Screening-Verfahren zum
Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität und die Verwendung von Bak-
terien der Gattung Streptomyces sp. und der daraus gewonnenen
10 Epoxidhydrolasen zur enantioselektiven Epoxidhydrolyse.

15

20

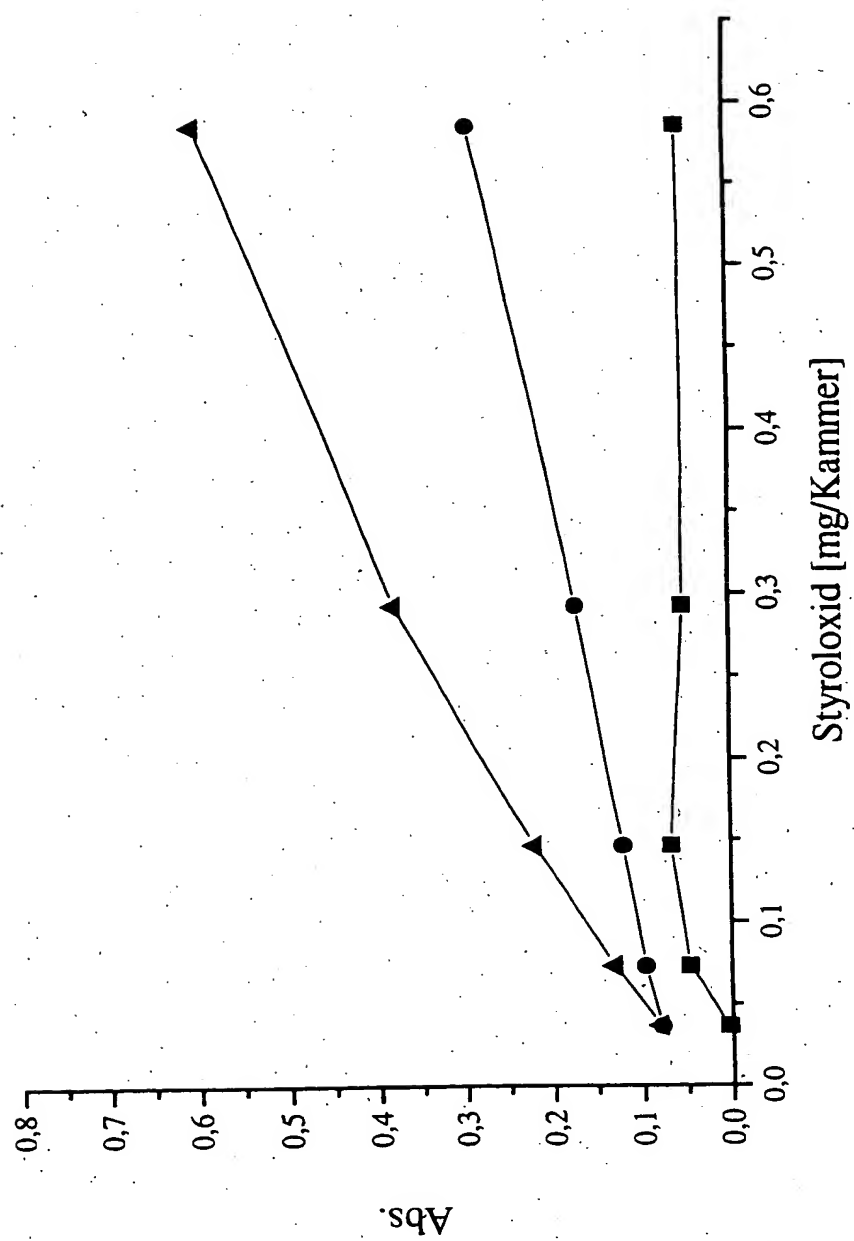
25

30

35

40

45

Fig.1

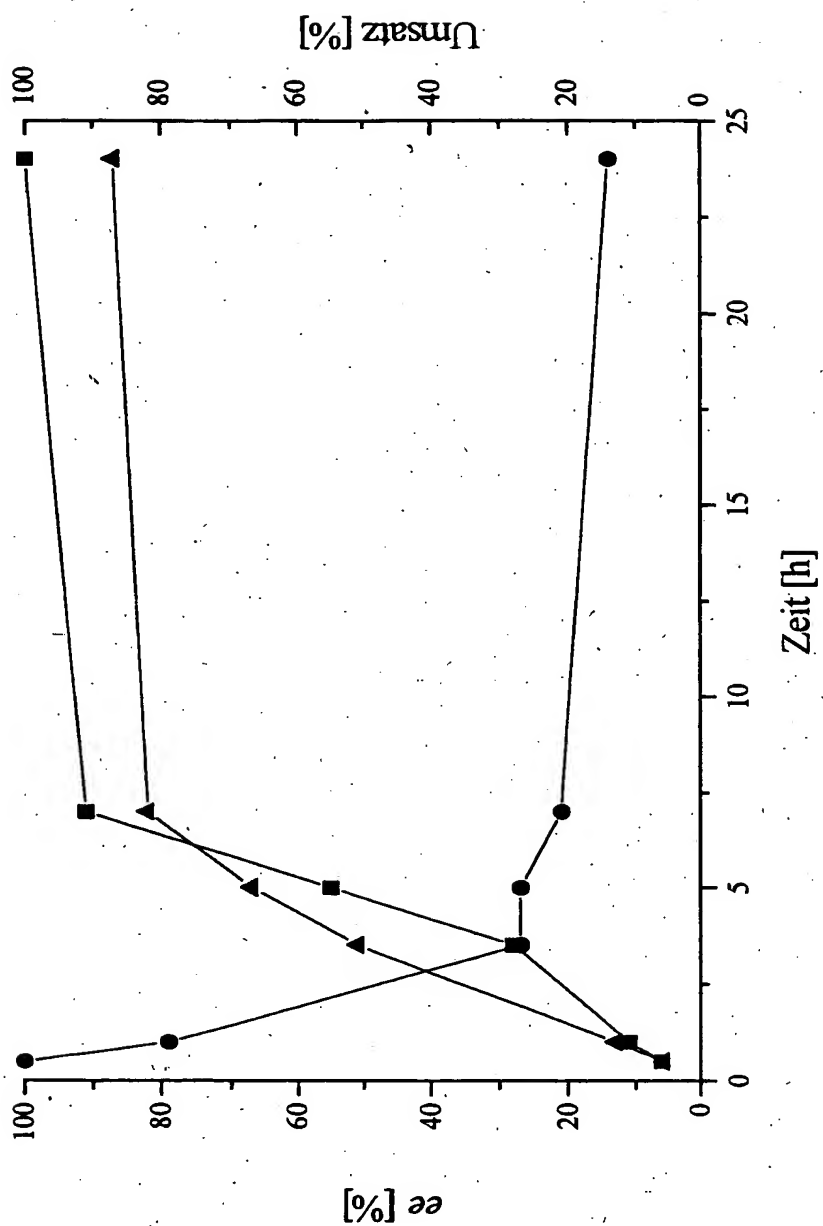


Fig. 2

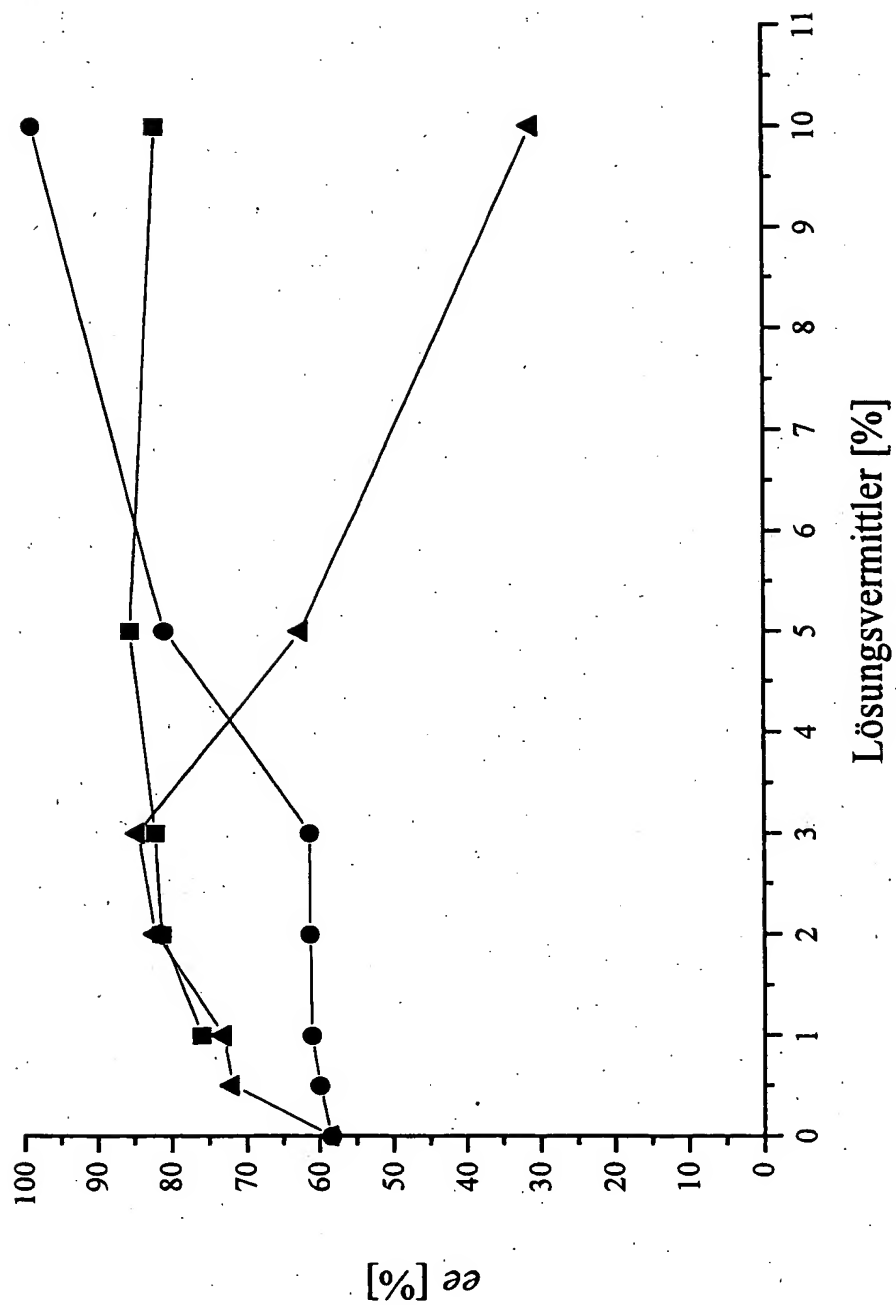


Fig. 3